

HLA-DR형 형별검사에 있어서 PCR-Sequence Specific Primer법과 혈청학적 검사법의 비교

계명대학교 의과대학 임상병리학교실, 마산삼성병원 임상병리과*

윤경식·전효진·장영우·최귀전·전동석·김재룡·김영재*

= Abstract =

A Comparative Study of HLA-DR Typing by Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers and Serology

Kyung Shik Yoon, Hyo Jin Chun, Young Woo Jang, Gui Jeon Choi,
Dong Seok Jeon, Jae Ryong Kim and Young Jae Kim*

*Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea;
Department of Clinical Pathology, Masan-Samsung Hospital, Masan, Korea**

Background : Matching for the HLA-A, B, and more importantly, DR between donor and recipient has a strong influence on long-term graft survival rates in organ transplantation, especially kidney and bone marrow. Serologic typing has long been used, but due to its high error rates of up to 25%, there is a clinical need for exact DNA typing method. Recently polymerase chain reaction (PCR)-based DNA typing techniques have been successfully used, among which PCR with sequence specific primer (PCR-SSP) is known to be reliable and by its simple post-amplification step, sufficiently rapid for HLA-DR typing in emergency situation such as cadaveric transplantation.

Methods : In this study, to evaluate the relative performance and reliability of the PCR-SSP method compared to serological typing, total 100 clinical samples from 85 renal transplant patients and 15 patients with other diseases were assayed for the HLA-DR typing by both serology and PCR-SSP. According to Wetzsteon et al., confidence level assignments of serological typing were made: clA and clB, no problem in

assignment; c1C and c1D, difficult in assignment. Fifteen B-lymphoblastoid cell lines were used as a source of reference DNA to confirm the specificity of PCR-SSP.

Results : All the amplification patterns using cell lines were easy to interpret and identical to the expected patterns. In serological typing using clinical samples, 60.0% were assigned as c1A and c1B and 40.0% were assigned as c1C and c1D, and there were 29(29.0%) discrepancies in HLA-DR typing between serology and PCR-SSP. Of these, four(13.8%) were serological failure; 18(62.0%) assignments of other alleles by PCR-SSP to serological "blank"; four(13.8%) differently assigned by serology and PCR-SSP; three(10.3%) allele splits not assignable by serology. But there was no single case of PCR-SSP failure.

Conclusions : HLA-DR typing by the PCR-SSP technique, especially a rapid modified method of PCR-SSP, is ideally suited for analyzing small number of samples simultaneously and is an alternative to serological typing in routine clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations.

Key Words : PCR-SSP, HLA-DR typing, Transplantation

서 론

효과적인 면역억제제의 개발에도 불구하고, 장기 이식 특히 신이식에 있어서 장기 공여자와 수용자 사이의 적합성, 특히 HLA-DR형의 적합성은 여전히 이식의 성패를 좌우하는 중요한 요소로 평가되고 있다[1,2]. HLA-DR형 형별검사는 혈청학적인 방법이 보편화되어 시행되고 있으나 오판율이 25% 이상으로서 결과의 신빙성이 낮은 문제점이 있다[3,4]. 이는 신뢰도가 높은 단일 특이성을 보유한 항혈청을 구하기 힘들고, 혈액투석환자에 있어서는 B형 림프구 분리가 힘들며, 비정상적으로 표현되는 class II 항원의 존재, DR52 군에 속하는 HLA-DR형들은 각 대립인자간에 교차반응의 빈도가 높기 때문이다. 최근 HLA 유전자의 구조가 밝혀지고[5], HLA 형별판정에 있어서도 분자생물학적 분석기법의 이용이 임상의학 분야에서 보편화되고 있다. 따라서 최근에는 혈청학적 HLA-DR 검사를 대신할 수 있는 보다 신뢰성이 높은 검사 방법으로서 isoelectric focusing[6], 제한효소절편 길이다양성(restriction fragment length polymorphism:RFLP)[7] 및 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction:PCR)[8] 등의 DNA검사가 시도되고 있다.

이중에 PCR 기법은, 단시간 내에 목표로 하는 DNA만을 수백만 배 증폭함으로써, 특이도가 높고 신속하며 소량의 검체로도 검사가 가능하기 때문에 HLA-DR형 분석을 위한 임상검사로서 가치가 높다고 평가되고 있다. HLA-DR PCR 검사는 인간의 6번 염색체 단위에 위치한 DRB1-4 유전자의 DR 형별 다형성 부위를 적절한 시발체(primer)를 이용하여 분석하는 방법으로서, PCR-sequence specific oligonucleotide probe(SSOP)[8,9], PCR—"reverse" dot blot[10,11], PCR-RFLP[12], PCR-direct sequencing, PCR—"finger printing"[13], PCR-single strand conformation polymorphism(SSCP)[14] 및 PCR-sequence specific primer(SSP)[15-17] 등의 다양한 변법들이 있다. 이러한 PCR 검사들이 임상적으로 이용되기 위해서는 우선적으로 검사비용이 저렴하고, 검사의 신속성 및 높은 신뢰성이 전제되어야 한다. PCR-SSOP, PCR—"reverse" dot blot, PCR-RFLP, PCR-direct sequencing, PCR—"finger printing" 및 PCR-SSCP 등은 검사의 신뢰도는 높으나 검사비용이 비교적 고가이고 신속하지 못하다는 단점이 있다. PCR-SSP는 DR 형별 DNA 다형성 부위와 특이적으로 결합하는 시발체로 증폭하는 방법으로서, Olerup과 Zetterquist [16]는 기타의 PCR법에 비해 검사시간이 신속하고 검사비용이 저렴한 상대적인 장점이 있으며 화

Table 1. B lymphoblastoid cell lines used in PCR-SSP^a

Cell line	HLA-DR Type ^b		HLA-DRB Allele ^c			
	DR	DR52/53	DRB1 *	DRB3 *	DRB4 *	DRB5 *
EHM	DR1					—
PGF	DR15(2)	—		—		0101
AVL	DR3	DR52		0101	—	
LKT3	DR4	DR53		—	0101	
SPOO10	DR11(5)	DR52		0202		
BM16	DR12(5)	DR52		0202		
WT47	DR13(6)	DR52		0301		
EK	DR14(6)	DR52		0202		
AMALA	DR14(6)	DR52		0101		
BURK	DR7	DR53				
MADURA	DR8	DR52				
DKB	DR9	DR53				
RAJI ^d	DR10/DR3	DR52		ND		

^a: Bodmer et al., 1997[18]; Kimura et al., 1992[19]

^b: Types defined by serology

^c: Types defined by nucleotide sequence analysis

^d: Heterozygote B cell line

ND: Not defined

학적 반응이 정교하여 신뢰도가 높은 검사법으로 보고하였다. 따라서 PCR-SSP는 혈청학적인 검사를 대신할 수 있는 유용한 HLA-DR 형별 검사법으로 기대할 수 있다. 이에 본 연구에서는 장기이식을 위해 HLA 검사가 의뢰된 장기 공여자와 수용자를 대상으로 HLA-DR 형별 검사로서 PCR-SSP법과 혈청학적 검사법을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 임상검체

HLA-DR 형 분석을 위한 혈청학적 검사법과 PCR-SSP법에 의한 DNA 검사법을 비교하기 위하여 1994년 1월부터 12월까지 계명대학교 동산의료원 임상병리과에 신이식을 위하여 HLA 형별 검사가 의뢰된 85명(이하 신이식군: 신질환자 52명, 장기제공자 33명)과 기타 질환자 15명(만성간질환자 3명, 백혈병환자 7명, 뇌사자 5명) 등 총 100명을 대상으로 하여 heparin 혹은 EDTA 처리된 말초혈액을 혈청검사법과 PCR-SSP법의 검체로 사용하였다.

2. 세포주

PCR-SSP법의 특이도를 검증하기 위하여 Bodmer 등[18]과 Kimura 등[19]에 의해 HLA-DRB 유전형과 이에 해당하는 HLA-DR 혈청형 등의 특징이 밝혀진 바 있는 15개의 B-림프구 세포주를 이용하였으며, 각 세포주의 HLA-DR 혈청형 및 DRB (B1, B3, B5) 유전형 등의 자세한 특성은 Table 1과 같다. 이 중 RAJI 세포주를 제외한 세포주는 DRB1*0101, 0301, 0405, 0701, 0801, 0901, 1101, 1201, 1302, 1401, 1402 및 1501 등의 HLA-DRB1 대립유전자의 동형접합체(homozygote) 유전형을 보유한 세포주였으며, RAJI 세포주는 DRB1*1001/0301의 이형접합체(heterozygote) 유전형을 보유한 세포주였다.

3. 혈청학적 HLA-DR형 검사

혈청학적 방법에 의한 HLA-DR형 검사는 상품화된 HLA-DR kit (Biostest사, 독일)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 환자의 말초혈액 30 mL을 채취하여 heparin으로 처리한 다음 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, 스웨덴)을 이용하여 밀도구배

- 윤경식 외 HLA-DR 검사의 PCR-SSP와 혈청학적 방법의 비교 -

Table 2. Confidence level assigned to serologic HLA typing^a

	anti-DR reactivity		Ass. Ag reactivity (DR52/53, DQ)
	Cytotoxicity scoring	Extraneous reactivity	
c1A (certain)	8+	No	As anticipated
c1B (reasonably certain)	8+	No	Not as anticipated
c1C (may be present)	6+ or 6+	Little	As anticipated
c1D (unidentified Ag)	No anti-DR reactivity	Yes	Not as anticipated
			Detected

^a: Wetzsteon et al., 1992[20]

원심분리법으로 단핵구세포를 분리하였다. 분리한 단핵구층은 RPMI 배지로 2회 세척하고 원침하여 상층액을 제거한 다음 원심분리용 Fisher 시험관에 0.8 mL의 RPMI를 가하고 세포침사층을 잘 풀어 주었다. 혈소판, 과립구 및 단핵구를 제거하고 순수한 림프구를 얻기 위하여 트롬빈 처리를 하였는데, 100 units/mL의 thrombin 한 방울을 가하여 육안으로 작은 흰 덩어리가 생길 때까지 전도 혼합 후 세척 원침하고 5% 우테아 혈청(Gibco사, 미국)이 함유된 RPMI 배지(이하 FCS-RPMI라고 함)를 가하여 림프구 부유액이 0.5 mL이 되도록 조정하였다.

B 림프구의 분리는 nylon-wool 법으로 실시하였는데, B 림프구 분리용 column은 투명한 빨대(직경 6-7 mm, 길이 10-13 cm)에 FCS-RPMI에 잘 푸는 nylon-wool 50 mg을 4-5 cm 길이가 되도록 채웠다. 다시 37°C에서 30 분간 가온하고 FCS-RPMI로 2-3회 세척하여 제조하였다. 이 column에 림프구 부유액을 흘려서 첫 10 mL의 세포용액을 T 림프구로 사용하였다. 다시 37°C로 가온된 FCS-RPMI 3-4 mL을 흘려준 다음 4°C로 냉각된 FCS-RPMI 10 mL을 흘려서 B 림프구를 시험관에 받아 세포수가 2-3×10⁶/mL이 되도록 조정하였다.

HLA-DR 혈청형 검사는 microlymphocytotoxicity 법으로 실시하였는데 각 micro-well에 B 림프구 1 μL을 가하여 37°C에서 1시간 동안 항원-항체 반응을 실시한 다음 가토보체 5 μL을 다시 가하여 25°C에서 1시간 방치하였다. 5% Eosin Y 2 μL을 가하여 염색하고 formaline (pH 7.2) 7 μL를 가하여 고정시켰다. 각 DR 검사용 plate를 커버글라스로 덮고 1시간이 지난 다음 판독하였다. HLA-DR 혈청형의 판독은 Wetzsteon 등[20]의 혈청학적 검사

판독을 위한 신뢰도 기준 (confidence level; cl)에 따라 c1A, c1B, c1C 및 c1D 등으로 분류하여 판정하였다(Table 2).

4. PCR-SSP

세포주와 임상검체로부터 DNA는 phenol-chloroform법에 의하여 분리하였으며, 일부 임상검체는 신속한 DNA 분리를 위하여 염석 (salting-out) 방법을 이용하였다[16].

Phenol-chloroform법에 의한 DNA 분리는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 10 mL의 말초혈액을 Ficoll-Paque 밀도구배 원심분리법으로 분리한 단핵구세포 혹은 세포주 침사를 TEN 완충액 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1 mM NaCl] 300 μL로 재부유한 후 10% SDS 25 μL와 100 mg/mL의 proteinase-K 20 μL를 가하고 강하게 진탕한 후 37°C에서 2-14 시간 방치하였다. 각 검체를 원심후 석회산 (phenol) 200 μL와 chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 200 μL를 첨가하여 30초간 진탕하고 12,000 × g에서 5 분간 원침한 후, 상층액을 취하여 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 동량 가하여 5 초간 진탕한 다음 12,000 × g에서 5 분간 원침하였다. 상층액에 10 μL의 5 M NaCl을 가하여 혼합하고 100 μL의 냉 무수에 탄올을 가하고 잘 혼합하여 -20°C에서 30 분간 방치한 다음 10 분간 원침하여 DNA 침사를 얻었다. 1 mL의 70% 에탄올을 DNA 침사에 가하고 잘 혼합한 후 12,000 × g에서 20 분간 원침하여 정제된 DNA 침사를 얻었다. 공기중에서 DNA 침사를 말린 후 20 μL의 증류수에 녹였다. 분광광도계를 이용하여 분리정제된 DNA의 순도와 농도를 측정한 다음 DNA 농도를 50 ng/μL로 조정하여 검사

Table 3. Nucleotide sequence, and specificities of the PCR primer pairs used for identification of the allele series DR1-DR18, and DR52 and DR53 superspecificities by the PCR-SSP techniques

Primer mix	5'-primer	Sequence	3'-primer	Sequence	Size of PCR	Amplified specificities Product
	5'01	5'-TTGTGGCACCTAACGTTGAAT	3,047	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	255	DRB1*0101-DRB1*0103
				3,048 5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCCA		
15	5'02	5'-TCCTGTGGCAGCCTAACGAG	3'01	5'-CCCGCGCTGCTCCAGGAT	197	DRB1*1501-DRB1*1502
16	5'02	5'-TCCTGTGGCAGCCTAACGAG	3'02	5'-AGGTGTCCACCGCGGCG	213	DRB1*1601-DRB1*1602
3	5'03	5'-TACTTCCATAACCAGGAGGACA	3'03	5'-TGCAGTAGTTGTCCACCCG	151	DRB1*0301-DRB1*0302
17	5'06	5'-GACGGAGCGGGTGCGGTA	3'048	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	217	DRB1*0301
18	5'03	5'-TACTTCCATAACCAGGAGGACA	3,047	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	189	DRB1*0302, DRB1*1302, DRB1*1305, DRB1*1402, DRB1*1403
4	5'04	5'-GTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA	3'047	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	260	DRB1*0401-DRB1*0411
				3,048 5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCCA		
7	5'07	5'-CCTGTGGGGGGTAAGTATA	3'079	5'-CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	232	DRB1*0701-DRB1*0702
8	5'08	5'-AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	3'05	5'-CTGCAGTAGGTGTCCACCCG	214	DRB1*0801-DRB1*0804
9	5'09	5'-GTTTCTTGAAGCAGGATAAGTT	3'079	5'-CCCGTAGTTGTGTCTGCACAC	236	DRB1*0901
10	5'10	5'-CGGTTGCTGGAAAGACGCG	3'07	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	204	DRB1*1001
11	5'05	5'-GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	3'06	5'-CTGGTAGTCCAGTACTCCT	176	DRB1*1101-DRB1*1104
12	5'08	5'-AGTACTCTACGGGTGAGTGTT	3'08	5'-CACTGTGAAGCTCTCCACAG	248	DRB1*1201-DRB1*1202
13.1	5'03	5'-TACTTCCATAACCAGGAGGACA	3'10	5'-CCCGCTCGTCTCCAGGAT	130	DRB1*1301-DRB1*1302
13.2	5'05	5'-GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	3'045	5'-TGTTCACACTCGGCGCT	171	DRB1*1303-DRB1*1304
14.1	5'05	5'-GTTTCTTGGAGTACTCTACGTC	3,11	5'-TCTGCAATAGGTGTCCACCT	224	DRB1*1401, DRB1*1404, DRB1*1405
14.2	5'03	5'-TACTTCCATAACCAGGAGGACA	3'12	5'-TCGACCGCGGCCGCC	140	DRB1*1303, DRB1*1402, DRB1*1403
52	5'52.1	5'-TTTCTTGGAGCTGCGTAAGTC	3'13	5'-CTGTTCCAGGACTCGGCGA	171	DRB3*0101-DRB3*0301
	5'52.2	5'-GTTTCTTGGAGCTGCTTAAGTC	3'14	5'-GCTGTTCCAGTACTCGGCAT	173	
53	5'53	5'-GAGCGAGTGTGGAACCTGA	3'048	5'-CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	213	DRB4*0101

전까지 -70°C에 보관하였다.

. 염석변법에 의한 DNA 분리는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 1 mL의 적혈구 용혈완충액 [0.32 M sucrose, 1% (v/v), Triton X-100, 5 mM MgCl₂:6H₂O 및 12 mM Tris-HCl]을 EDTA 처리된 500 μL의 말초혈액에 가한 후 13,000 rpm에서 1 분간 원침하였다. 백혈구 핵침전물을 다시 중류수로 13,000 rpm에서 1 분간 세척하여 80 μL의 proteinase-K 완충액 (0.375 M NaCl, 0.12 M EDTA; pH 8.0)에 부유시키고 30 μL의 proteinase-K (10 mg/mL), 20% SDS 20 μL와 240 μL의 중류수를 가하여 잘 혼합한 뒤 55°C에서 10 분

간 진탕 배양하였다. 6M NaCl 100 μL를 가한 후 약 15 초간 격렬하게 진탕 혼합한 뒤 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 시켜 수거된 상층액에 -20°C의 에탄올 1 mL을 가하여 DNA를 침전시켰다. DNA 침사에 100 μL의 중류수를 가하여 30 초간 진탕한 DNA 용액은 검사 전까지 -70°C에 보관하였다.

PCR-SSP법에 의한 DRB1, DRB3과 DRB4 allele 분석에 이용된 염기서열 특이 (sequence-specific) primer의 위치, 염기서열, 길이 및 특이성은 Table 3과 같다[5, 16]. 각 primer는 한국생공 (주, 한국)에서 합성하고 정제하였다. DRB1 allele 증폭을 위

- 윤경식 외 : HLA-DR 검사의 PCR-SSP와 혈청학적 방법의 비교 -

한 primer는 10개의 5'-primer와 13개의 3'-primer를 이용하였고 이들을 적절히 조합하여 17종의 PCR-SSP를 시행함으로써 각각 HLA-DR1에서 DR18의 혈청형에 해당되는 DRB1 allele을 동정하는데 사용하였다. 각 primer 혼합물의 명칭은 특이 혈청형과 동일하게 정의하였으며 (18*와 14.2* primer 혼합물은 예외), 13과 14에 대해서는 각각의 혈청형에 해당하는 적절한 primer 조합을 1종류의 혼합물로 제한할 수 없었기 때문에 2종류의 primer 혼합물 (13.1과 13.2 및 14.1과 14.2)을 사용하여 각각 DR13과 DR14군의 allele을 결정하는데 이용하였다. DR52와 DR53 super-antigen 군의 혈청형에 해당하는 DRB3과 DRB4 allele 증폭을 위한 primer를 사용함으로써 DRB1 allele 동정의 특이성을 확인하였다. DRB3*0101-DRB3*0301 allele은 2개의 5'-primer와 2 개의 3'-primer를 함유하는 primer 혼합물을 사용하여 증폭하였으며, DRB4*0101 allele은 각 1개의 5'-primer와 3'-primer를 함유하는 primer 혼합물을 사용하여 증폭하였다.

DRB1 유전자의 3번째 intron은 각 HLA-DRB1 allele에 공통적으로 존재하는 비특이적인 영역이므로 5'-primer인 C5와 3'-primer인 C3를 반응혼합물에 첨가하여 PCR-SSP의 내부 양성대조로서 이용하였다. C5는 DRB1 유전자 exon 3의 3' 말단의 codon 173-179에 위치하며 염기서열은 5'-TGC CAA GTG GAG CAC CCA A-3' 이었고, Tm은 60°C이며, C3는 exon 4의 5'말단의 codon 193-200에 위치하며 염기서열은 5'-GTA TCT TGC TCT GTG CAG AT-3'이었고, Tm은 60°C로서 증폭산물의 크기는 796 bp였다.

PCR-SSP법에 의한 HLA-DR 형 분석을 위하여 각 검체마다 DR1-DR18형 동정을 위한 17종의 DRB1 반응혼합물, DR52와 DR53 특이성을 정의하기 위한 각 1종의 DRB3와 DRB4 반응혼합물 및 음성대조 (DNA 대신에 증류수로 대치) 등의 20종의 PCR을 시행하였다. 반응혼합물은 50 ng의 계놈성 DNA 용액 4 μL와 PCR 완충액 [Perkin Elmer사, 미국: 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 0.001% (w/v) gelatin]과 각각 200 μM농도의 dNTPs (Perkin Elmer사, 미국: dATP, dCTP, dGTP와 dTTP), 1 μM의 HLA-DR DNA형 동정을 위한 염기서열 특이 DRB primer,

각 0.2 μM의 증폭대조 primer인 C3와 C5 및 0.5 unit의 AmpliTaq (Perkin Elmer사, 미국) 등이 함유되게 하여 총 25 μL가 되도록 하였다.

PCR 증폭은 GeneAmp-9600 thermocycler(Perkin Elmer사, 미국)를 사용하여 30 three-temperature cycle(94°C에서 20초간 denaturation, 65°C에서 50 초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension)로 1 시간 20분간 실시하였다. 또한 신속한 PCR-SSP의 수행을 위하여 30 two-temperature cycle(94°C에서 20초간 denaturation, 65°C에서 60초간 annealing-extension)로 1시간 5분간 실시하였다.

Agarose 겔 전기영동법으로 PCR 산물을 가시화하였다. PCR 반응혼합물 10 μL에 2.5 μL의 gel loading buffer[bromphenol blue와 xylene cyanol이 함유된 30%(v/v) glycerol]를 가하여, 0.8% agarose 겔에서 8.5 × 10 cm의 소형 겔은 0.5 × TAE 완충액(89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)에서 15V/cm로 10-15 분간 이동시켰고, 20 × 20 cm의 대형 겔은 7-8 V/cm로 25-30분간 이동시켰다. UV transilluminator하에서 gel을 검사하고 폴라로이드 카메라로 사진촬영하였다.

성 적

1. Wetzsteon 신뢰도 기준에 의한 환자유형별 혈청형 DR 판정

혈청학적 방법으로 HLA-DR형 검사를 실시한 100예의 임상검체중 Wetzsteon 신뢰도 기준에 의하면 clA군이 29예 (29.0%), clB군이 31예 (31.0%), clC군이 30예 (30.0%) 및 clD군이 10예 (10.0%)였다.

신이식군 85예의 임상검체중 신뢰도 기준에 따른 분류에서 보면, clA, clB, 및 clC군이 각각 27예 (31.8%)였으며, clD군이 4예 (4.7%)였다. 신수용자군 52예의 임상검체에서는 clA, clB, clC 및 clD 군이 각각 13예 (25.0%), 15예 (28.8%), 21예 (40.4%) 및 3예 (5.8%)였고, 신공여자군 33예에서는 각각 14예 (42.4%), 12예 (36.4%), 6예 (18.2%) 및 1예 (3.0%)로서 신질환자인 신수용자군에서 HLA-DR 판정이 힘든 clC와 clD군의 빈도가 신공여자군에 비해 높았다(Table 4).

기타 환자군 15예의 임상검체중 신뢰도기준에

Table 4. Confidence level of serologic assignment by patient type

Patient type	Confidence level: No. (%)					
	A	B	C	D	A+B	C+D
Renal transplantation group (n=85)						
Recipient (n=52)						
Dondor (n=33)						
Other disease group (n=15)						
Chronic liver disease(n=3)						
Leukemia (n=7)						
Brain death (n=5)						
Total (n=100)						

따른 분류에서 보면, clA, clB, clC 및 clD군이 각각 2예 (13.3%), 4예 (26.7%), 3예 (20.0%) 및 6예 (40.0%)로서 건강한 신공여자군에 비해 clC와 clD군의 빈도가 높았다. 만성간질환자군 3예의 검체중에서는 clA, clB, 및 clC군이 각각 1예 (33.3%)였으며, clD군은 한 예도 없었다. 백혈병환자군 7예중 clA군은 한 예도 없었으며, clB와 clC군이 각각 1예 (14.3%)로서 모두 만성골수성백혈병 환자였으며, clD군은 5예 (71.4%)로서 3예는 급성골수성백혈병이었고 2예는 급성림프성백혈병이었다. 뇌사자군 5예중에는 clA, clC 및 clD군이 각각 1예 (20.0%)였으며, clB군이 2예 (40.0%)였다(Table 4).

2. PCR-SSP법의 특이도

세포주를 이용하여 PCR-SSP법을 실시한 결과 Fig. 1에서와 같이 모든 경우에서 96 bp의 증폭대조 band와 40 bp 근처의 primer-dimer band를 관찰할 수 있었으며, 이들 band들은 130-250 bp의 allele 혹은 group 특이 증폭 band와는 구별이 용이하여 HLA-DR형 판정에는 어려움이 없었다. 그러나 3, 13.1과 14.1 primer 조합에서 증폭된 band는 130-151 bp로서 그 크기가 작아 primer-dimer band와 구별에 주의를 요하였다. AVL과 WT47을 제외한 동형접합체 세포주를 이용한 PCR-SSP에서는 단 하나의 특이 band만이 증폭되어 DR3군과 DR6군을 제외한 DR형 판정에는 문제가 없었다. 그러나 DRB1*0301 유전형을 보유한 AVL에서는 3과 17 primer 조합에 해당하는 두개의 band가 동시에 증폭되었고 DRB1*1302를 보유한 WT47에서도 DR18과 DR13.1에서 두개의 증폭 band가 관

찰되었으며, DRB1*1001/*0301을 보유한 heterozygous 세포주인 RAJI에서는 10, 3과 17 primer 조합에서 세개의 증폭 band가 관찰되어 DR3군과 DR6군의 판정에 주의를 요하였다. 이는 3 primer 조합은 DRB1*0301-DRB1*0302, 17 primer 조합은 DRB1*0301, 18 primer 조합은 DRB1*0302, DRB1*1302, DRB1*1305, DRB1*1402 및 DRB1*1403를 보유한 경우에 특이성이 있으므로, 3과 17 primer 조합에서 두개의 band가 증폭되면 DR17형, 3과 18의 primer 조합에서 각각 두개의 band가 관찰되면 DR18형으로 판정하였다. 또한 13.1 primer 조합은 DRB1*1301-DRB1*1302, 14.2 primer 조합은 DRB1*1305, DRB1*1402 및 DRB1*1403를 보유한 경우에 특이성이 있으므로, 18과 13.1 primer 조합에서 두개의 band가 증폭되면 DR13형, 14.2의 primer 조합에서 두개의 band가 관찰되면 DR14형으로 각각 판정하였으며, DRB1*1301을 보유한 HHKB 세포주는 18 primer 조합에서 증폭되지 않으므로 13.1 primer 조합에서 단일 증폭 band가 관찰되는 경우에도 DR13형으로 판정하였다.

PCR-SSP법에 의한 HLA-DR형 판정을 위한 양성대조로서 DR52군의 DRB3*0101-DRB3*0301과 DR53군의 DRB4*0101 증폭을 위해 52와 53 primer 조합을 이용하였다. DR52군에 속하는 DRB3*0101 allele을 보유한 AVL, HHKB 및 AMALA와 DRB3*0202 allele을 보유한 SPOO10, BM16 및 EK와 DRB3*0301을 보유한 WT47에 대해 PCR-SSP를 실시한 결과 52 primer 조합에서 171 혹은 173 bp의 증폭 band를 관찰할 수 있었으므로, DR17(3), DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6)

—윤경식 외 : HLA-DR 검사의 PCR-SSP와 혈청학적 방법의 비교—

Table 5. Discrepancy in HLA-DR type assignment between serology and PCR-SSP

Serology	PCR-SSP	No. of cases	Total (N=29)
	Initial PCR failure		0
Allele not assignable by serology			4
DR?/DR?	DR14/DR15 DR4/DR12 DR4/- DR1/DR14	1 1 1	
Allele missed by serology			18
DR1/- DR4/- DR7/- DR9/- DR11/- DR13/- DR14/- DR15/- DR1/- DR9/- DR14/- DR13/- DR9/- DR8/-	DR1/DR8 DR4/DR8 DR7/DR8 DR9/DR8 DR11/DR8 DR13/DR8 DR14/DR8 DR15/DR8 DR1/DR13 DR9/DR13 DR14/DR13 DR13/DR14 DR9/DR4 DR8/DR11	1 1 2 1 1 2 1 1 1 1 2 1 2 1	
Allele wrongly assigned by serology			4
DR4/DR13? DR1/DR13 DR4/DR13 DR13/-	DR4/- DR1/DR14 DR4/DR8 DR4/DR18	1 1 1 1	
Allele splits not assigned by serology			3
DR4/DR6 DR7/DR6 DR11/DR2	DR4/DR13 DR7/DR13 DR11/DR15	1 1 1	

및 DR8형의 판정을 명확히 할 수 있었다. 또한 DR53군에 속하는 DRB4*0101을 보유한 LK3, BURK 및 DKB에 대해 PCR-SSP를 실시한 결과 53 primer 조합에서 213 bp의 중폭 band를 관찰할 수 있었으므로, DR4, DR7 및 DR9형의 판정을 명확히 할 수 있었다. 그러나 DR52군에 속하는 DR8 혈청형을 보유한 MADURA는 52 primer 조합에서 특이 band의 중폭이 관찰되지 않았는데 이는 DR8 haplotype은 DRB3 유전자가 존재하지 않기 때문이다.

100예의 임상검체를 이용한 PCR-SSP에서는 아래의 경우를 제외하고는 이형접합체 혹은 동형접합체 모두 명확한 HLA-DR형 판정을 할 수 있었으며, 예상되었던 DR52 및 DR53군의 DNA band가 중폭되었다(Fig. 2, 3). PCR-SSP법에 의한 HLA-DR형 판정에 주의를 요하였던 경우를 살펴보면, 1) 1예에서 1, 3, 18 primer 조합에서 3개의 중폭이 된 경우 DR1, DR18의 이형접합체로 판정하였으며, 2) 1예에서 3, 18 primer 조합에서 2개의 중폭이 된 경우 DR18 동형접합체로 판정하였

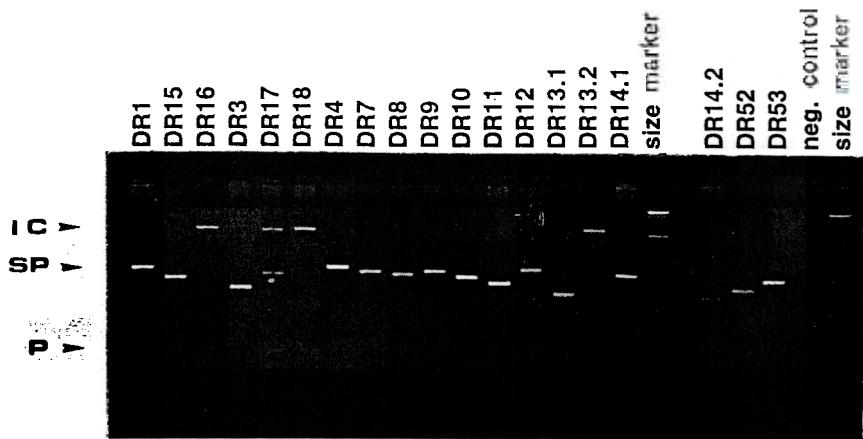


Fig. 1. Illustration of the specificity and the relative size of the PCR products obtained in DR "low resolution" PCR-SSP typing using B lymphoblastoid cell lines. IC:internal control, SP:specific primer, P:primer dimer.

고, 3) 18과 13.1 primer 조합에서 동시에 중폭이 된 경우가 1예 있었는데 이는 DR13형으로 판정하였고(Fig. 4), 앞에서 설명한 바와 같은 HLA-DR 형 판정기준에 따랐을 때 판정이 애매한 경우는 없었다. 임상검체중 DR13형으로 판정된 경우는 23 예였으며, 1예를 제외하면 모두 다른 DR 형 allele 을 보유한 이형접합체였다. 또한 23예중 primer 조합 13.1에서만 중폭된 경우, 즉 DRB1 * 1301 allele 을 보유한 경우가 7예(30.4%)였으며, primer 조합 18과 primer 조합 13.1이 동시에 중폭된 경우, 즉 DRB1 * 1302 allele을 보유한 경우가 14예(69.6%) 였다.

재현성을 보기 위하여, 세포주 15예와 임상검체 20예를 대상으로 서로 다른 검사자에 의해 각각 2 회 반복하여 PCR-SSP를 실시하고 판독하였을 때 모든 경우에서 그 결과가 서로 일치하였다.

3. 혈청학적 방법과 PCR-SSP법의 비교

혈청학적 방법과 PCR-SSP법 간의 HLA-DR 형 판정이 불일치된 경우는 모두 29예 (29.0%)였으며, PCR-SSP의 판정이 곤란하였던 경우는 한 예도 없었다. 불일치된 경우를 유형별로 나누어 보면, 1) 혈청학적 판정기준 clD군에 속하여 혈청학적 방법으로는 HLA-DR 형 판정이 불가능하였던 경우가 4예 (13.8%)로서 PCR-SSP법으로는 각각 DR14/DR15, DR4/DR12, DR4,- 및 DR1/DR14로 판정되었다. 2) 혈청학적인 방법으로는 HLA-DR 형이 동형접합체 혹은 blank였으나 PCR-SSP법으로는 이형접합체로 판정되었던 경우는 모두 18예

(62.0%)로서 혈청학적 방법으로 DR8형을 판정하지 못하였던 경우가 10예로서 가장 많았으며, DR13이 5예, DR4가 2예 및 DR11이 1예의 순이었다. 3) 혈청학적 판정기준 clA 혹은 clB군에 속하여 HLA-DR 형 판정이 비교적 용이하였던 경우 중 4예 (13.8%)에서 혈청학적 방법과 PCR-SSP법 사이에 HLA-DR 형의 판정이 불일치하였는데 혈청학적으로는 DR13형으로 판정되었으나 PCR-SSP 법으로는 blank, DR14, DR8, 혹은 DR18형으로 판정되었다. 4) 혈청학적인 방법으로 DR split형을 판정하지 못했던 경우가 3예 (10.3%)였으며, 혈청학적 판정이 DR6군이었던 2예는 PCR-SSP법으로는 DR13형으로, 혈청학적 판정이 DR2군이었던 1 예는 PCR-SSP법으로는 DR15형으로 각각 판정되었다 (Table 5).

혈청학적 판정의 신뢰도 기준에 따라 혈청학적 방법과 PCR-SSP법 사이의 판정이 불일치된 경우는 clA군 29예중 5예 (17.2%), clB군 31예중 5예 (16.1%), clC군 30예중 10예 (33.3%)였으며, clD 군 10예중 9예 (90.0%)로서 혈청학적인 방법으로 HLA-DR 판정이 힘들었던 clC와 clD군에서 그 비도가 높았다 (Fig. 5).

검사 소요시간은 크게 DNA 분리과정, PCR 혼합물 제조과정, PCR 과정 및 전기영동과정으로 나누어지며, DNA 분리과정이 2~12시간, PCR 혼합물 제조과정이 1시간, PCR 과정이 1시간 20분 및 전기영동과정이 30분으로서 총 5시간 이상이 소요되었다.

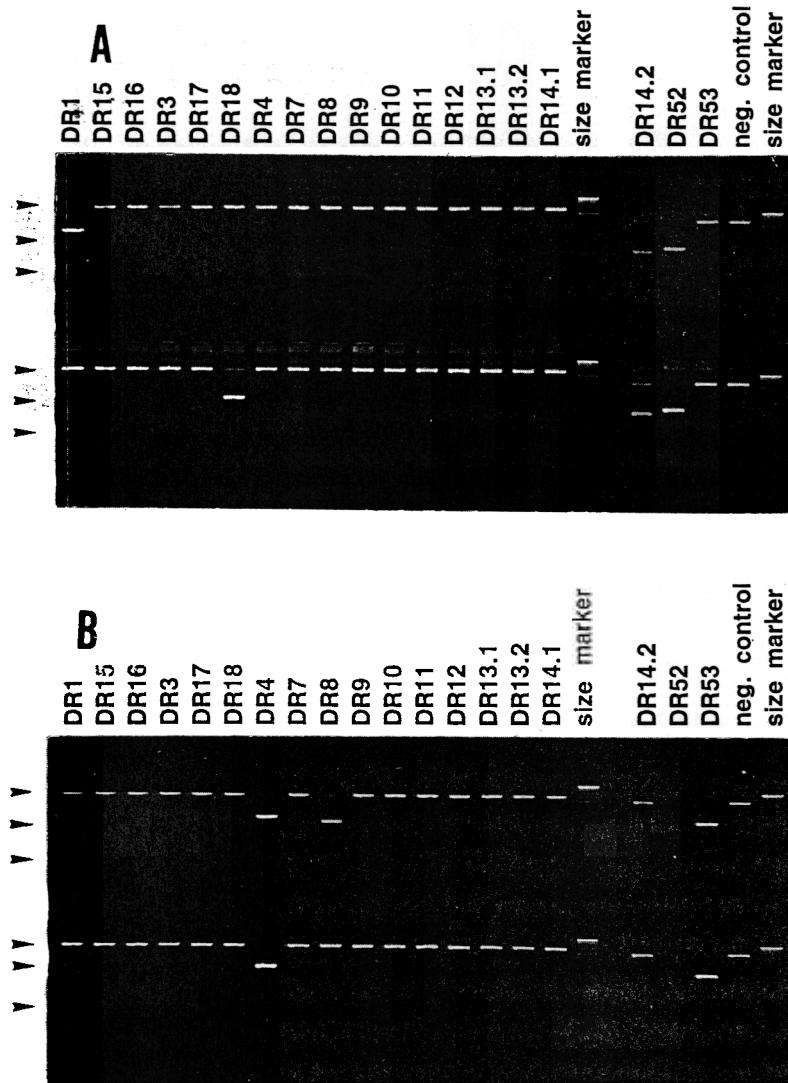


Fig. 2. Illustration of the HLA-DR "low resolution" PCR-SSP typing using peripheral blood of kidney transplant donors or recipients, of which HLA-DR superspecificity was typed as DR52 group(A), and DR53 group(B).

고 찰

신이식에 있어서 장기공여자와 수용자 사이에 조직적합성의 중요성은 오래전부터 인지되어 왔으나 HLA-DR형의 중요성에 대해서는 아직도 논란의 여지가 있다. 1980년 이전의 보고[21]에 의하면 사체 신이식의 경우 HLA-DR형의 일치정도가 HLA-A, -B, -C형의 적합정도에 비해 이식장기의 생존에 보다 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 그러나, 효과적인 면역억제제로 알려진 cyclosporine(CyA)이 임상적으로 사용된 이후인

1983년과 1986년 사이의 보고[22]에 의하면 조직적합성여부가 장기생존률(graft survival)에는 큰 영향을 미치지 않으나, HLA가 불일치되었을 경우 급성거부반응의 빈도는 다소 증가한다고 하였다. 최근의 보고[2]에 의하면, HLA-DR 형이 적합한 신이식에서 장기생존률이 85%로서, HLA-DR 형이 적합하지 못한 경우의 78%보다 높아 HLA-DR 형이 장기생존률을 결정하는 하나의 요인으로 새로이 인식되고 있다. 이는 최근에 혈청학적 DR형 검사 및 교차반응 검사의 기술이 다소 향상되어 비교적 정확한 HLA-DR형 판정이 가능하였기 때문인 것으로 생각된다. 혈청학적 검사의 기술적인 개

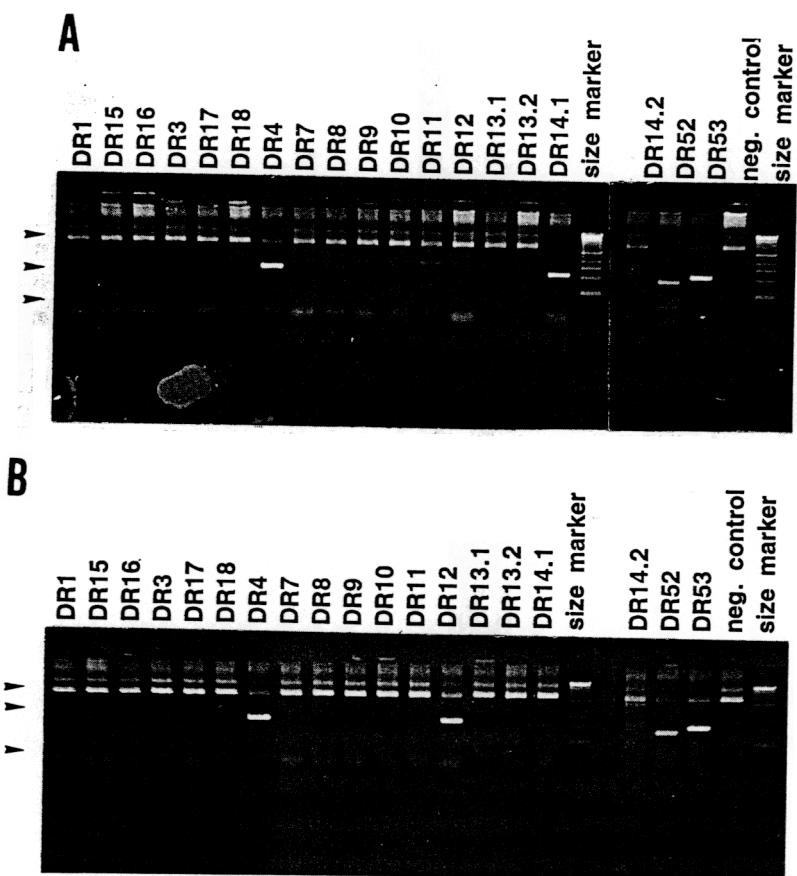


Fig. 3. Illustration of the HLA-DR "low resolution" PCR-SSP typing using peripheral blood of kidney transplant donors or recipients, of which HLA-DR superspecificity were typed positive for both DR52 and DR53 group (A:DR4, DR14; B:DR4, DR12).

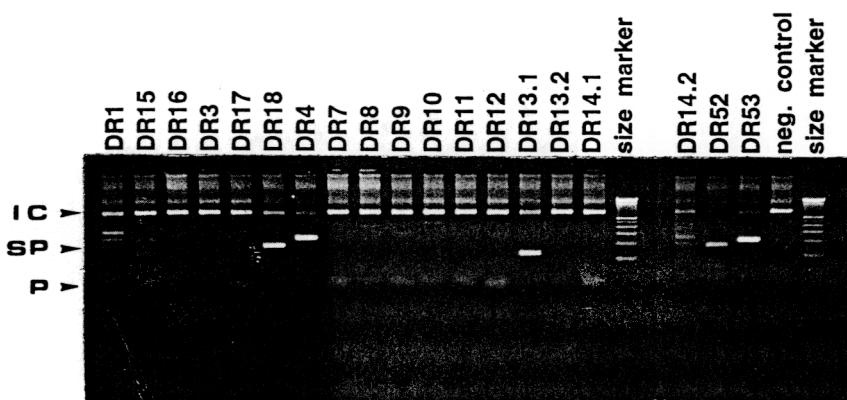


Fig. 4. An example of interpretation of "low resolution HLA-DR" PCR-SSP typing (DR4, DR13). DR type was assigned as DR13 when both DR13 and DR18 specificities were amplified.

선은 HLA-DR 항원의 발현 강도가 높고 생존력이 강한 B 세포의 분리를 위한 면역자기 (immuno-magnetic)법 등의 세포분리 기술의 발전에 의한

것으로 생각되고 있다. 그러나 혈액투석환자에 있어서는 B형 림프구 분리가 힘들며, 백혈병 환자, 요독증 환자 및 사체 장기공여자에서는 발현이 낮

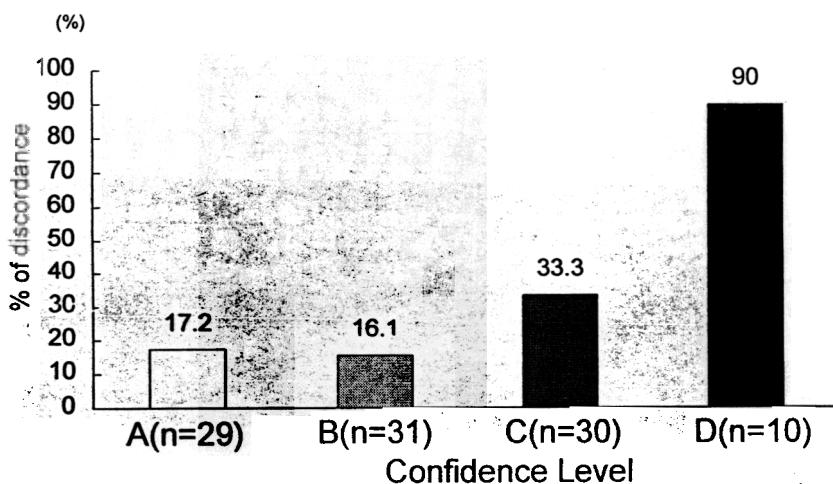


Fig. 5. Discordance between serologic and PCR-SSP DR typing(N=100) according to confidence level of serologic assignment.

거나 비정상적으로 표현되는 class II 항원이 있으며, DR52 군에 속하는 HLA-DR형들은 각 대립인자간에 교차반응의 빈도가 높기 때문에 혈청학적인 방법에 의한 HLA-DR형 검사의 오판율은 아직도 25%에 이르고 있고 검사실 사이의 결과가 일치하지 않는 경우가 많다[4]. 또한 골수이식에 있어서도 이러한 점의 중요성이 인식되고 있는데, 이는 골수이식은 아미노산 서열의 단 한 개의 차이만 존재하여도 급성거부반응을 야기할 수 있기 때문이다[23,24]. 폐와 심장 등의 고형장기 이식에 있어서는 외과적 수기가 이식의 성공여부를 결정하는 가장 중요한 요소이다. Opelz[1]가 과거에 시행하였던 고형장기 이식군의 HLA-DR형 적합성 여부를 DNA법으로 후향적으로 조사해 본 결과 HLA-DR 형의 적합성이 장기생존률에 상당한 영향을 미친다고 하였으며, 과거에 실시하였던 혈청학적인 방법이 HLA-DR형을 정확히 판정하지 못하였기 때문에 고형장기 이식에 있어서 HLA-DR 검사의 중요성이 간파되었을 가능성이 있다고 보고하였다.

본 연구에서도 혈청학적방법으로 판독이 곤란하였던 Wetzsteon 등[20]의 신뢰도 등급 cIC와 cID에 해당하는 경우가 40.0%로서 높은 빈도를 보였으며, 또한 신이식군의 장기수용자군에서 46.2%로 장기제공자군의 21.2%에 비해 상당히 높은 점은 신질환자에서 혈청학적인 HLA-DR 검사의 판독이 어렵다는 사실을 잘 입증해주고 있다. 따라서 신이

식에 있어서 HLA matching을 정확히하기 위해서는 혈청학적인 방법을 대신할 수 있는 보다 확실하고 경제성이 있는 새로운 검사법의 개발이 필요하다.

최근에 들어와서 분자생물학의 급속한 발전으로 HLA 유전자의 DNA 염기서열과 각 allele의 특성이 밝혀지고[5], HLA 분자의 미세구조와 면역학적 기능에 대해서 자세하게 규명되고 있다[25]. HLA-DR 분자는 HLA class II 항원으로서 B 림프구 등의 세포에만 선택적으로 표현된다. HLA class II 분자는 heterodimeric membrane glycoprotein으로서 6번 염색체의 단완에 위치하는 DRA와 DRB 유전자에 의해 code된 α 와 β 사슬로 구성된다. DRB1 유자는 두 가지의 두드러진 특징이 있다. 첫 번째 특징으로는 높은 빈도의 다형성 (polymorphism)이 관찰되는데, 염기서열 분석 결과 현재까지 약 180여개의 DRB1 allele (DRB1*0101-DRB*1001)이 확인되었으며, DR1에서 DR18 까지 특이 혈청형이 정의되어 있다[5,18]. DRB1 유전자의 주요 다형성 부위는 두 번째 exon의 9-13, 26-33과 67-74으로서 주로 codon 3 영역에 집중되어 있으며, 각 allele 간에는 이 다형성 부위의 염기서열이 동일한 경우가 흔히 있다[26]. 또 다른 특징은 제 2의 DRB 유전자 (2nd expressed DRB1)인 DRB3, DRB4와 DRB5는 DRB1과 서로 밀접한 관련성이 있어서 이 두 유전자는 동시발현 (coexpression) 된다[18]. DR2 (DR15와 DR16)

혈청형을 coding하고 있는 DRB1 유전자는 DR51 문자를 coding하고 있는 DRB5 유전자와, DR3 (DR17과 DR16), DR5 (DR11과 DR12) 및 DR6 (DR13과 DR14) 혈청형을 coding하고 있는 DRB1 유전자는 DR52 문자를 coding하고 있는 DRB3 유전자와, DR4, DR7, DR9를 coding하고 있는 DRB1 유전자는 DR53 문자를 coding하고 있는 DRB4 유전자와 각각 연결되어 있다. 그러나 DR1, DR8 및 DR10을 coding하고 있는 DRB1유전자는 어떠한 제2의 DRB 유전자와도 연결되어 있지 않다. DRB1-DRB3/B4/B5의 상호관계는 HLA 검사실에서 정확한 DR형 판정을 위한 기준으로 삼고 있다 [16]. 이러한 HLA-DRB 유전자의 특성을 분자생물학적 기법으로 분석함으로써 HLA-DR형을 동정할 수 있는데, isoelectric focusing[6], RFLP[7] 및 PCR[8] 등의 DNA 분석법이 HLA-DR형 검사로서 시도되기 시작했다.

특히 PCR 기법은 DNA를 단시간 내에 수백만 배로 증폭함으로써 소량의 검체로도 검사가 가능하며 목표로 하는 DNA만을 증폭할 수 있어서 특이도 또한 매우 높고 신속하기 때문에 앞으로 HLA-DR형 형별 검사에 임상적으로 이용할 가치가 가장 높다고 할 수 있다. PCR법은 DRB1-DRB3/B4/B5 유전자의 다형성부위를 적절한 시발체를 이용하여 선택적으로 증폭하여 분석하는 방법으로서, PCR-SSOP, PCR-“reverse” dot blot, PCR-RELP, PCR-direct sequencing, PCR-“fingerprinting”, PCR-SSCP, 및 PCR-SSP 등 많은 종류의 변법들이 있으며 그 임상적 가치에 대한 조사가 이루어지고 있는 실정이다. 이러한 PCR 검사방법들이 임상적으로 이용되기 위해서는 우선적으로 검사비용이 적절해야 하며 적어도 6시간 이내에 검사의 결과를 판독할 수 있도록 신속해야 하고 예민도 및 특이도가 높아서 검사 결과의 정확도가 높아야 한다. PCR-SSOP, PCR-“reverse” dot blot, PCR-RFLP, PCR-direct sequencing, PCR-“fingerprinting” 및 PCR-SSCP는 여러 DR형에 공통적으로 존재하는 DNA 부위를 증폭한 다음 증폭된 DNA의 다형성을 각기 다양한 분자생물학적 기법으로 관찰하는 방법으로서 예민도 및 특이도가 높아서 검사 결과의 정확도는 높으나 검사 비용이 고가이며 검사가 신속하지 못하다는 단점이 있다. PCR-SSP는 20여 종류의 DR형별 다형성이 존재

하는 DNA 부위와 특이적으로 결합하는 40여 종류의 시발체를 이용하여 PCR을 실시한 다음 DR형별로 증폭된 DNA의 존재 유무를 확인하는 방법으로서 여타의 PCR 변법과 비교할 때 다음과 같은 상대적인 장점이 있다[16]. (1) PCR-SSP는 해상도가 높아서 이형접합체의 발견이 PCR-SSOP에 비해 용이하다. (2) PCR-SSP는 결과의 판독이 쉬워서 이형접합체의 발견이 용이하다. (3) PCR-SSP의 화학적 반응이 증폭된 DNA에 SSO probe가 결합하는 화학적 반응 보다 더 정교하기 때문에 특이도가 높다. (4) PCR-SSP는 증폭된 DNA의 다형성을 관찰해야 되는 과정이 생략되고 일상적인 전기영동에 의해 증폭된 DNA 유무를 관찰하기 때문에 2시간 이내에 결과의 판독이 가능하여 신속하고 간편하다. (5) 검사비용이 저렴하고 검사 수기가 쉽다. (6) PCR-SSP는 융통성이 높은 기법으로 향후 많은 HLA class-II형 형별 분석이 가능할 것이다.

PCR-SSP에 의한 HLA-DR 다형성 분석에 있어서 primer는 특이 allele 혹은 group을 선택적으로 증폭할 수 있도록 고안되어야 한다. 이 방법은 primer와 complementary-DNA의 염기서열이 완전히 일치하는 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 반응이 보다 효과적으로 증폭되는 PCR 반응의 특성에 의하며[27], 이러한 현상은 PCR cycle의 초기 단계에 두드러진다. 따라서 PCR-SSP 형별검사법의 특이성은 PCR 반응의 일부분에 속한다고 볼 수 있으며, allele의 판정은 증폭산물의 존재 유무에 따라 결정되고 이는 이는 agarose 겔 전기영동이나 형광발생법으로 확인할 수 있다[16,28-31]. 그러나 검체내의 PCR 방해물질이 있으면 위음성 반응이 야기될 수 있으므로 반드시 내부양성대조로 동시에 증폭하여야 하며, 이때 내부양성대조는 분석하고자 하는 HLA 대립인자와 인접한 다형성이 없는 DNA 부위를 선정하여야 한다[32]. 또한 primer의 3' 말단부위에서 한 개 정도의 염기서열이 일치하지 않는 경우에는 mispriming에 의해 비특이적인 증폭이 일어날 수도 있으므로 primer 디자인에 세심한 주의를 요한다. Bein 등[33]은 이러한 위양성 반응을 줄이기 위하여 nested PCR법을 고안하였다. 본 연구팀에서는 이 연구에 이어 HLA-DR 분석을 위한 PCR-SSP를 kit화하기 위한 연구에 nested PCR법을 적용하여 실험을 진행중

- 윤경식 외 : HLA-DR 검사의 PCR-SSP와 혈청학적 방법의 비교 -

에 있다.

본 연구에서 고안된 primer와 HLA-DR 형 분석을 위한 primer 조합과 PCR-cycle의 온도 및 시간 조건은 allele 혹은 group 특이 DNA 증폭에 있어 높은 예민도와 특이도가 있었기 때문에 DR1-18 및 DR52, 53의 판정에는 큰 문제가 없었다. 또한 Olerup과 Zetterquist의 보고[16]에 의하면 PCR-SSP법과 Taq1 DRB-DQA-DQB RFLP법은 100%의 일치도를 보였다. HLA-DR17, DR18, DR13, DR14의 경우 각각 3과 17, 3과 18, 18과 13.1, 18과 14.2의 primer 조합에서 동시에 2개의 band가 증폭이 되어 판정에 주의를 요하였으나, 세포주 및 임상검체를 이용한 검사에서 HLA DR 판정이 불가능한 경우는 없었다.

앞에서 언급한 바와 같이 HLA-DR형에 있어서 혈청학적인 방법은 검사의 신뢰도가 부족하여 DNA 검사법과 비교해 볼 때 DR형 판정이 서로 불일치 하는 경우가 많은 것으로 평가되고 있다. 두 방법간의 판정 불일치를 유형별로 살펴보면 [16], (1) 두 대립인자 HLA-DR 항원성이 서로 유사할 경우 혈청학적인 방법에서는 그 결과가 소위 "serologic blank"로 나타날 확률이 높으나, PCR-SSP에 의해서는 "serologic blank"의 DR형을 밝힐 수 있게 될 것이므로 상당수의 혈청학적 검사상 동형접합체가 PCR-SSP 검사로는 이형접합체로 밝혀질 것이다. (2) 비정상적으로 표현되는 DR형 항원 혹은 항원간의 교차반응에 의해 혈청학적인 방법으로는 잘못된 DR형으로 판독될 수 있으나, PCR-SSP에 의하면 DR형의 정확한 분석이 가능할 것인데, 특히 DR6형 혹은 DR52군에 속하는 DR형들에 있어서 이러한 가능성성이 높다. (3) B형 림프구의 분리가 어렵거나 분리한 B형 림프구의 생존능력이 떨어지는 경우로서 예를 들면 혈액투석을 받고 있는 환자의 경우에는 혈청학적인 방법으로는 결과의 판독이 힘든 경우가 많은데 PCR-SSP법은 계농성 DNA를 분리하는 기법이므로 이러한 경우에도 정확한 DR형 분석이 가능할 것이다. (4) 혈청학적인 방법에 사용되는 항혈청은 단일한 특이성 (monospecific)을 가진 것은 얻기가 힘이 들고 항혈청의 종류가 다양하지 않으므로 "split" DR형의 정확한 감별은 혈청학적 방법으로는 어려우며, PCR-SSP는 "split"형을 결정하는 DNA 다형성 부위의 염기서열만 알 수 있으면 분

석이 가능하여 보다 정확하고 다양한 DR형 검사가 가능할 것이다.

본 연구에서는 혈청학적 방법과 PCR-SSP법간의 HLA-DR형 판정이 불일치된 경우는 모두 29예 (29.0%)로서 Marsh 등[3]과 Papola 등[4]의 보고와 거의 일치하였다. 혈청학적인 방법으로는 HLA-DR형이 동형접합체 혹은 blank였으나 PCR-SSP법으로는 이형접합체로 판정되었던 경우가 PCR-SSP법의 결과로 볼 때 주로 DR8, DR13 및 DR4 형이었으며, 혈청학적 판정기준으로 cIA 혹은 cIB 군에 속하여 HLA-DR형 판정이 비교적 용이하였음에도 불구하고 PCR-SSP법과 판정이 불일치한 경우는 주로 DR13과 DR14를 오판한 경우였다. 따라서 본 연구의 혈청학적 검사 (Biostest, 독일)에 이용된 항혈청이 DR4, DR13 및 DR14형의 판정에 문제가 많았음을 시사한다. 그리고 혈청학적인 방법으로는 DR6와 DR2군의 split형을 판정하지 못했던 경우나 혈청학적 판정기준 cID군에 속하여 혈청학적인 방법으로는 HLA-DR형 판정이 불가능하였던 경우에 PCR-SSP법으로는 DR형 판정이 용이하였으므로 PCR-SSP법이 신뢰도가 높은 방법임을 알 수 있었다.

최근 우리나라에서도 뇌사자의 장기를 제공받아 장기이식을 실시하는 경우가 늘어나고 있는데 응급상황에서 이루어지는 뇌사자 장기이식의 경우에는 혈청학적 방법을 대신할 수 있는 신속하고 정확한 검사법이 필요하다. 세포학적 방법에 의한 HLA 형별 검사는 검사시간이 길어서 이 경우에는 이용하기가 어려우나, DNA 검사법 중 PCR-SSP 법은 간편하고 검사시간이 단축되어 이러한 목적의 검사에 적합하였다.

이상의 결과를 요약하면, PCR-SSP법은 DNA 다형성분석에 의한 HLA-DR형 형별검사이므로 특이도, 예민도 및 재현성이 높고 B형 림프구의 분리가 필요 없고 소량의 검체로도 검사가 가능하여, 앞으로 혈청학적인 방법에 의한 HLA-DR형 형별검사를 대신할 수 있을 것으로 생각된다. 이 방법은 특히 (1) 혈청학적 검사로는 DR형의 판독이 곤란한 Wetstone의 신뢰도군 C 혹은 D의 혈청학적 검사 결과의 확인, (2) 신이식술에 실패한 경험이 있는 환자 즉 신장 수여자의 DR형 항원에 매우 민감하게 반응하는 소위 "high responder"와 그 장기 공여자의 DR형 형별검사 (3), B형 림프구의

분리가 어려운 사체 공여자의 DR형 형별검사, (4) 장기공여자 은행에 제공될 공여자의 DR형 형별검사, (5) 골수이식을 위한 제대혈의 DR형 형별검사와, (6) 사체 장기를 이용한 뇌사자 장기이식술에 있어 신속한 HLA-DR 검사법으로 가치가 높을 것으로 생각된다.

요 약

배 경 : 장기이식 특히 신이식과 골수이식에 있어서는 장기공여자와 수용자 사이에 조직적합성 특히 HLA-DR형의 적합 정도가 이식의 성공여부를 결정하는 중요한 인자로 알려져 있다. 혈청학적인 방법에 의한 HLA-DR형 검사는 결과의 신뢰성이 낮아 새로운 검사방법이 모색되고 있다. 최근 분자생물학적 기법의 발전으로 PCR을 이용한 여러 가지 방법이 시도되었으며 이중 PCR-SSP법이 신속하면서도 결과의 판독이 쉬워 임상적 유용성이 높은 것으로 알려져 있다.

방 법 : 신이식을 위하여 HLA 형별검사가 의뢰된 85명과 기타 질환군 환자 15명 등 총 100명의 환자로부터 얻은 말초혈액을 검체로 하여 종래의 혈청학적 방법과 PCR-SSP법으로 HLA-DR형 검사를 실시하여 그 결과를 비교하고, 15개의 B 림프구 세포주를 이용하여 PCR-SSP의 특이성을 확인하였다.

결 과 : 대상검체중 혈청학적방법으로 HLA-DR 검사결과 판독에 무리가 없었던 신뢰도 등급 cIA와 cIB가 60.0%였으며, 판독이 곤란하였던 신뢰도 등급 cIC와 cID가 40.0%였다. 세포주를 이용한 PCR-SSP법의 특이도를 조사한 결과 모든 세포주에서 예상하였던 특이 band의 증폭을 관찰할 수 있었으며, 임상검체를 이용한 검사결과에서도 모든 예에서 명확한 band가 증폭되어 HLA-DR형 판정이 용이하였다. 혈청학적 방법과 PCR-SSP법 간의 HLA-DR형 판정이 불일치된 경우는 모두 29예 (29.0%)였다. 불일치된 예의 유형은 혈청학적 방법상 HLA-DR형 판정(13.8%)이나, split형 판정(10.3%)이 불가능하였던 경우, 혹은 혈청학적 검사상 동형접합체(혹은 blank)였으나 PCR-SSP법으로 이형접합체로 판정된 경우(62.0%)와 혈청학적 방법과 PCR-SSP법에 의한 HLA-DR형 판정이 서로 다른 경우(13.8%) 등이었으며, PCR-SSP의

판정이 곤란하였던 경우는 한 예도 없었다. 신속 PCR-SSP법으로 임상검체 20예와 세포주로서 시험한 결과 모두 통상적인 PCR-SSP법과 그 결과가 일치하였으며, 검사 소요시간은 2시간이었다.

결 론 : 이상의 결과로 PCR-SSP법에 의한 HLA-DR형 검사는 B형 림프구의 분리가 필요 없이 소량의 검체로도 신속 정확한 검사가 가능하여 응급상황에서 이루어지는 뇌사자 장기이식에 특히 유용할 것으로 생각되며, 앞으로 경제성이 높고 검사수기가 간단한 HLA-DR형 검사용 PCR-SSP kit의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Opelz G. HLA matching should be utilized for improving kidney transplant sucess rates. Transplant Proc 1991;23:46-50.
- Leivestad T, Berger L, Thorsby E. Beneficial effect of DR matching on cadaveric renal graft survival in Scandiatransplant. Transplant Proc 1992;24:2447-8.
- Marsh B, Berte C, Tiercy J-M, Reith W. Diversity and regulation of HLA class II genes. In:Silver J, ed. Molecular biology of HLA class II antigens. 1st ed. Boca Raton:CRC Press, 1990:201-10.
- Papola F, Valeri M, Torlone N, Provenzani L, Canossi A, Piazza A, et al. Comparison between HLA-DR serologic typing and oligotyping in kidney transplant:A single center experience. Transplant Proc 1993;25:2239-40.
- Marsh SGE, Bodmer JG. HLA class II nucleotide sequences, 1992. Tissue Antigens 1992; 40:229-43.
- Monos DS, Mickelson E, Hansen JA, Baker L, Zmijewski CM, Kamoun M. Analysis of DR and DQ gene products of the DR4 haplotype in patients with IDDM:Possible involvement of more than one locus. Hum Immunol 1988;23:289-99.
- Bidwell J. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and DQ antigens. Immunol Today 1988;9:18-23.

—윤경식 외 : HLA-DR 검사의 PCR-SSP와 혈청학적 방법의 비교—

8. Vaughan RW, Lanchbury JSS, Marsh SGE, Hall MA, Bodmer JG, Welsh KI. The application of oligonucleotide probe to HLA class II typing of the DRB sub-region. *Tissue Antigens* 1990;36:149-55.
9. Mickelson E, Smith A, McKinney S, Anderson G, Hansen JA. A comparative study of HLA-DRB1 typing by standard serology and hybridization of non-radioactive sequence-specific oligonucleotide probes to PCR-amplified DNA. *Tissue Antigens* 1993;41:86-93.
10. Buyse I, Docorte R, Baens M, Cuppens H, Semana G, Emond MP, et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 1993;41:1-14.
11. Lee KW, Cho HC. Reverse-SSO hybridization provides an accurate and simple HLA-DR typing: A comparative study with serologic typing. *J Korean Med Sci* 1994;9:414-26.
12. Yunis I, Salazar M, Yunis EJ. HLA-DR generic typing by AFLP. *Tissue Antigens* 1991;38:78-88.
13. Clay TM, Bidwell JL, Howard MR, Bradley BA. PCR-finger printing for selection of HLA matched unrelated marrow donors. *Lancet* 1991;337:1409-52.
14. Carrington M, White M, Dean M, Mann D. Determination of DQ and DQ alleles using single strand conformation polymorphism: Description of an allele at DQB2 locus (Abstract), 11th International Histocompatibility Workshop and Conference, Yokohama, Japan, 1991 (November):6-13.
15. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197-204.
16. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR Typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35.
17. Lynas C, Hurlock NJ, Copplestone JA, Prentice AG, McGonigle RJS. HLA-DR typing for kidney transplants: Advantage of polymerase chain reaction with sequence specific primers in a routine hospital laboratory. *J Clin Pathol* 1994;47:609-12.
18. Bodmer JGE, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Chrton D, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* 1997;49:297-321.
19. Kimura A, Dong RP, Harada H, Sasazuki T. DNA Typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* 1992;40:5-12.
20. Wetzsteon PJ, Head MA, Fletcher LA, Norman DJ. Confidence levels assigned to serologic HLA-DR typing predict DNA HLA-DR typing discrepancies. *Transplant Proc* 1992;24:2283-4.
21. Ting A, Moris PJ. HLA matching and crossmatching in renal transplantation. *Lancet* 1978;1;575-82.
22. Lundgren G, Groth CG, Albrechtsen D, Brynger H, Flatmark A, Frodin L, et al. HLA-matching and pretransplant blood transfusion in cadaveric renal transplantation: A changing picture with cyclosporin. *Lancet* 1986;2:66-9.
23. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B, Yans SY. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med* 1990;323:1818-22.
24. Hansen JA, Anasetti C, Petersdorf EW, Choo SY, Mickelson EM, Martin PJ. The status of clinical marrow transplantation and current issues in donor matching. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. *HLA 1991. vol 2.* Oxford: Oxford University Press, 1992:13-9.
25. Zmijewski CM. The major histocompatibility

- complex:Methodologies. In:McClatchey KD, ed. Clinical laboratory medicine. Maryland: Williams & Wilkins, 1994:771-99.
26. Bell JI, Todd JA, McDevitt HO. Molecular structure of human class II antigens. In: Dupont B, ed. Immunobiology of HLA. vol 2. New York:Springer-Verlag, 1989:40-9.
27. Fugger L, Morling N, Ryder LP, Odum N, Svejgaard A. Technical aspects of typing for HLA-DP alleles using allele-specific DNA in vitro amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *J Immunol Methods* 1990; 129:175-85.
28. Wu DY, Uguzzoli L, Pal BK, Wallace RB. Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2757-60.
29. Chehab FF, Kan YW. Detection of sickle cell anemia mutation by color DNA amplification. *Lancet* 1990;335:15-7.
30. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summer C, Klaschka N, et al. Analysis of any point mutation in DNA:The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17:2503-16.
31. Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 1992;34:64-74.
32. Begovich AB, Erlich HA. HLA typing for Bone marrow transplantation:New polymerase chain reaction-based methods. *JAMA* 1995; 273:586-91.
33. Bein G, Glaeser R, Kirchner H. Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens* 1992;39:68-73.